

Über die Tryptophanprobe im Liquor cerebrospinalis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Gerhard Stalder

von Basel



1950

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Herrn Prof. Dr. *E. Freudenberg*.

Tag der Promotion: 8. Februar 1950.



Sonderdruck aus Annales Paediatrici, Band 176, 1951.

Einleitung.

Die Diagnose der tuberkulösen Meningitis und deren Abtrennung von abakterieller Meningitis, Meningismus und Poliomyelitis im praeparalytischen Stadium stößt oft auf Schwierigkeiten. Die allgemeine Miliartuberkulose, welche besonders im Säuglings- und frühen Kleinkindesalter so häufig ihr trauriges Ende in einer meningealen Aussaat findet, wird klinisch in manchen Fällen gar nicht typisch manifest. Ebenso lassen der Nachweis von Tuberkelbazillen im Spinnwebesgerinnsel und die Zuckerbestimmung im Liquor oft im Stich.

Brugi hat wohl als erster darauf hingewiesen, daß in der Regel bei der tuberkulösen Meningitis das Tryptophan im Liquor vermehrt ist. Obgleich diese Tryptophanvermehrung keineswegs eine für die tuberkulöse Meningitis spezifische Reaktion ist, so stellt sie doch ein für diese Krankheit sehr charakteristisches Symptom dar.

Im folgenden werde ich die angewendeten qualitativen Tryptophanproben und eine von mir ausgearbeitete Methode zur quantitativen Bestimmung des Liquor-Tryptophans beschreiben, fremde und eigene klinische Ergebnisse der Tryptophanbestimmung vergleichen und schließlich einige Ansichten über die Herkunft des Liquor-Tryptophans kurz besprechen.

Die qualitativen Tryptophanproben.

Adamkiewicz versetzte in Eisessig gelöstes Eiweiß mit konzentrierter Schwefelsäure und erhielt dabei an der Berührungsfläche einen violetten Farbring. Diese *Adamkiewicz*sche Eiweißprobe gelingt aber nicht mit jedem Eisessig.

Hopkins und *Cole* erklärten dies damit, daß die Farbreaktion nicht durch den Eisessig selber, sondern durch Glyoxylsäure verursacht wird, welche eine häufige Verunreinigung des Eisessigs darstellt und unter dem Einfluß von Luft-

sauerstoff, besonders bei Belichtung, aus Essigsäure entsteht. Sie verwendeten deshalb an Stelle von Eisessig Glyoxylsäure. Weiter stellten die gleichen Autoren später fest, daß die Reaktion nur dann positiv ausfällt, wenn das untersuchte Eiweiß Tryptophan enthält. Sie verwendeten denn auch diese Reaktion zum quantitativen Nachweis von Tryptophan.

Schließlich konnte *Winkler* nachweisen, daß die Tryptophanprobe nach *Adamkiewicz* und *Hopkins* zuverlässiger wird, wenn zu Beginn der Reaktion kleinste Mengen von Kupfersulfat hinzugefügt werden.

Andererseits fanden *Hehner* und später *Voisenet* Methoden zum Nachweis von Formaldehyd in Eiweißlösungen. *Voisenet* behandelte eine wäßrige Eiweißlösung mit nitrithaltiger Salzsäure und erhielt bei Gegenwart einer Spur Formaldehyd einen violetten Farbring.

Es stellte sich dann heraus, daß diese Reaktion ebenfalls von der Anwesenheit von Tryptophan im Eiweiß abhängig und mit der *Adamkiewicz-Hopkins*-Reaktion nah verwandt ist. *Voisenet* fand nämlich, daß sich sowohl aus Glyoxylsäure (dies hatten schon *Hopkins* und *Cole* erwähnt) als auch aus Essigsäure bei Sauerstoff- und Lichteinwirkung Formaldehyd bilden kann.

O. Fuerth und seine Mitarbeiter erkannten die *Voisenetsche* Probe als eine spezifische Tryptophanreaktion. Mit Indol, einem Abbauprodukt des Tryptophans, erhielten sie zwar keinen violetten, aber doch einen roten Farbring.

Sowohl die Reaktion nach *Adamkiewicz-Hopkins* als auch die nach *Voisenet* gelingen mit freiem und mit gebundenem Tryptophan.

Zum qualitativen Nachweis des Liquor-Tryptophans wird in der Kinderheilkunde die Tryptophanprobe nach *Voisenet* angewendet. Die dazu notwendigen Reagenzien sind: 1. 2%ige wäßrige Formaldehydlösung, 2. 0,6%ige, frische, wäßrige Natriumnitritlösung und 3. konzentrierte Salzsäure.

Technik: In ein Glas von ca. 2 cm Durchmesser werden 1, 2 oder 3 ccm frischer zentrifugierter Liquor gegeben, dazu 5, resp. 10 oder 15 ccm konzentrierte Salzsäure und 2 Tropfen der 2%igen Formaldehydlösung. Durch Umschwenken wird gut vermischt. Nach 5 Minuten überschichtet man vorsichtig mit 2 ccm der 0,6%igen Natriumnitritlösung. Nach weiteren 5 Minuten wird abgelesen: je nach der Intensität des an der Berührungsfläche entstandenen violetten Farbrings wird die Reaktion als (+), + oder ++ bezeichnet. Sie ist negativ, wenn der Farbring nicht violett, sondern gelb oder bräunlich erscheint.

Neben dieser *Voisenetschen* Probe habe ich auch die von *Winkler* verbesserte Tryptophanreaktion nach *Hopkins* angewendet. Sie ist empfindlicher als die Probe nach *Voisenet*.

Notwendige Reagenzien sind: 1. nach *Benedict* hergestellte verdünnte Glyoxylsäure, 2. 5%ige wäßrige Kupfersulfatlösung, 3. konzentrierte Schwefelsäure.

Technik (nach *Winkler*): In ein Reagenzglas kommen 1 ccm frischer zentrifugierter Liquor, dazu 2 Tropfen verdünnte Glyoxylsäure und 1 Tropfen 5%ige Kupfersulfatlösung. Schütteln und 5 Minuten warten. Dann läßt man vorsichtig 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure zufließen. Nach einigen Minuten erscheint an der Berührungsfläche ein violetter Farbring. Je nach seiner Intensität wird die Reaktion als (+), +, ++ oder +++ bezeichnet. Kommt kein Farbring zustande, so ist die Reaktion negativ.

Quantitative Tryptophanbestimmung.

Da meist nur wenige ccm Liquor zur Verfügung stehen, ist zur quantitativen Tryptophanbestimmung nur eine Methode brauchbar, welche Tryptophan noch in Mengen von 10—100 γ zuverlässig nachweist.

Die Tryptophanreaktion nach *Eckert* genügt diesen Anforderungen. Ebenfalls eine Farbreaktion, ist sie zwar nicht für Tryptophan spezifisch, indem auch Tyrosin, Phenol, Kresol, Indol, Skatol und o-, m- und p-Aminobenzoesäure die Probe färben. Aber diese Substanzen kommen entweder im Liquoreiweiß nicht vor, oder sie geben, wie das Tyrosin, nur in großen Mengen eine hellgelbe Farbe.

Nur freies Tryptophan gibt die *Eckertsche* Reaktion, das Liquor-Eiweiß muß also zur Bestimmung seines Tryptophangehaltes aufgespalten werden. Ich habe die Aufspaltung enzymatisch vorgenommen.

Zur quantitativen Tryptophanbestimmung im Liquor benötigt man:

1. 10%ige Trichloressigsäure zur Fällung des Liquor-Eiweißes.
2. Pankreatinlösung zur Eiweißverdauung. (200 mg Pankreatin «triple strength», ein gereinigtes Fermentgemisch, hergestellt von den Wilson Lab., Chicago, werden in 100 ccm 0,3%iger, wäßriger Sodalösung gelöst. Diese milchig-trübe Flüssigkeit lasse ich einen Tag stehen und entferne dann das nicht in Lösung gegangene Pankreatin durch Zentrifugieren und Filtrieren. Zu der nunmehr klaren Pankreatin-Lösung kommen noch 2 Tropfen Toluol.)

3. Für die Tryptophanreaktion nach *Eckert*: a) frische 1%ige wäßrige Natriumnitritlösung, b) 2,4 n Salzsäure, c) 4%ige wäßrige Sulfamidsäurelösung¹, d) 0,1%ige wäßrige N-(1-Naphthyl-)aethylendiamin-dihydrochlorid-Lösung¹. Diese Lösung ist licht- und sauerstoffempfindlich und muß deshalb in einer gut verschlossenen, dunklen Flasche im Eisschrank aufbewahrt werden.

Zur Messung der Farbintensität habe ich das Stufenphotometer von *Zeiß* mit dem Grünfilter Nr. 53 bei einer Schichtdicke von 20 mm verwendet. Geeicht wird das Kolorimeter mit einer Tryptophan-Verdünnungsreihe, wobei bekannte Mengen Tryptophan (mir stand l-Tryptophan der Firma F. Hoffmann-La Roche in Basel zur Verfügung) in je 2 ccm 1,2 n Salzsäure gelöst, nach *Eckert* behandelt (siehe unten) und kolorimetriert werden.

Technik der quantitativen Tryptophanbestimmung im Liquor: Diejenige Menge frischen und zentrifugierten Liquors, welche 5—10 mg Eiweiß enthält² (also z. B. 2—3 ccm eines 3%igen Liquors), wird in ein ca. 30 ccm fassendes Zentrifugenglas mit rundem Boden gegeben. Zu einem Quantum Liquor kommt das halbe Quantum 10%ige Trichloressigsäure. Nach einer Stunde wird 5 Minuten lang zentrifugiert (3000 Umdr. pro Min.), das Glas aus der Zentrifuge für weitere 5 Minuten ins kochende Wasserbad gestellt, noch einmal 5 Minuten lang zentrifugiert und erst jetzt die überstehende Flüssigkeit mit der Wasserstrahlpumpe sorgfältig abgesogen. Darauf wird das niedergeschlagene Eiweiß gewaschen, indem man ungefähr 10 ccm destilliertes Wasser in das Zentrifugenglas gibt und dieses wieder für 5 Minuten ins kochende Wasserbad stellt. Nachdem schließlich noch einmal 5 Minuten lang zentrifugiert worden ist, saugt man

¹ Beide Substanzen wurden mir in verdankenswerter Weise von der Firma F. Hoffmann-La Roche in Basel zur Verfügung gestellt.

² Die nötige Mindestmenge ist 0,5—1 mg Eiweiß.

das Wasser wieder ab. Dann stellt man das Glas für 24 Stunden in den Brutschrank, unverschlossen, damit das Eiweiß trocknen kann.

Immer ins gleiche Glas kommt nun 1 ccm der Pankreatinlösung, diesmal verschließt man mit einem Gummistopfen und stellt das Verdauungsgemisch wieder in den Brutschrank.

Als Vergleichslösung wird 1 ccm Pankreatinlösung in ein zweites, leeres, Zentrifugenglas gegeben, welches verschlossen ebenfalls in den Brutschrank kommt.

Nach 48 Stunden ist die Eiweißverdauung so weit fortgeschritten, daß nunmehr das abgespaltene, freie Tryptophan nach *Eckert* bestimmt werden kann.

Zu Verdauungsgemisch und verdauter Pankreatinlösung gibt man je 0,4 ccm der 1%igen Natriumnitritlösung und 1 ccm 2,4 n Salzsäure. Während 1½ Stunden wird hin und wieder geschüttelt. Dann fügt man je 1,6 ccm 4%ige Sulfamidsäurelösung hinzu, schüttelt wieder und wartet 10 Minuten. Schließlich werden noch je 4 ccm destilliertes Wasser und 2 ccm 0,1%ige N-(1-Naphthyl)-aethylendiamin-dihydrochlorid-Lösung dazugegeben.

Die nun langsam auftretende Rotfärbung erreicht nach 30 Minuten ihr Maximum und beginnt nach ca. 3 Stunden wieder abzublassen. Nach 30 Minuten kann also die Farbintensität im Kolorimeter gemessen werden. Die Vergleichs-Pankreatinlösung dient als Leerwert. Dabei wird ihr Tryptophangehalt vom Tryptophanwert des Verdauungsgemisches abgezogen.

Vor dem Kolorimetrieren sollen die Proben noch einmal zentrifugiert werden, damit allfällige Trübungen die Messung nicht verfälschen.

Ich habe das Verfahren einigen Prüfungen unterzogen. Davon seien zwei erwähnt:

Erstens habe ich einen Parallelversuch angestellt. 4mal 5 ccm einer ca. 1%igen Serum-Eiweiß-Lösung wurden unabhängig voneinander ausgefällt, verdaut und auf freies Tryptophan untersucht. Die Proben gaben folgende Werte: 1. Probe 0,465 Stupho-Skala, entspr. 46,5 γ Tryptophan, 2. Probe 0,445 Stupho-Skala, entspr. 44,5 γ Tryptophan, 3. Probe 0,435 Stupho-Skala, entspr. 43,5 γ Tryptophan, 4. Probe 0,45 Stupho-Skala, entspr. 45 γ Tryptophan.

Zweitens habe ich meine Tryptophanwerte mit denen verglichen, welche mit der mikrobiologischen Methode nach *Greene* und *Black* an möglichst identischem Material erhalten wurden. (Die mikrobiologischen Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. *Hatz* am physiologisch-chemischen Institut der Universität Basel ausgeführt.) Es ergaben sich folgende Werte:

Material	mikrobiologisch	chemisch
10 mg verdautes Eialbumin	102,7 γ Trph.	107 γ Trph.
10 mg verdautes Casein		
(nach <i>Hammarsten</i>)	104,7 γ Trph.	128 γ Trph.
idem	122,3 γ Trph.	125 γ Trph.
Liquor 1%o Ges. E.	14,9 γ Trph./ccm	16 γ Trph./ccm
idem	14,3 γ Trph./ccm	15 γ Trph./ccm
1 mg Pankreatin «triple strength»	6,15 γ	11 γ

Die mit der chemischen Methode erhaltenen Werte sind durchwegs etwas zu groß, was ich auf eine ganz geringfügige Opaleszenz meiner Verdauungsge-

mische zurückführe. Der kolorimetrische Wert dieser Opaleszenz kann bestimmt werden, indem man den roten Farbstoff an Tierkohle adsorbiert und abzentrifugiert.

Bestimmung des freien Liquor-Tryptophans.

Zur Bestimmung des freien, nicht im Liquor-Eiweiß gebundenen Tryptophans wird folgendermaßen vorgegangen: Zu 2 ccm frischem zentrifugiertem Liquor gibt man 0,4 ccm 1%ige Natriumnitritlösung und 0,2 ccm konzentrierte Salzsäure. Nach einer Stunde kommen 1,4 ccm 4%ige Sulfamidsäurelösung dazu, und dann wird geradeso fortgefahren, wie es oben beschrieben wurde.

Als Leerwert dienen weitere 2 ccm Liquor, die behandelt werden wie die Probe — mit dem einzigen Unterschied, daß an Stelle von Natriumnitritlösung 0,4 ccm destilliertes Wasser zugegeben werden.

Bei Anwesenheit von Indol und Skatol oder von Sulfonamid im Liquor kann das freie Tryptophan nicht bestimmt werden, da jene Stoffe eine starke Rotfärbung geben. Während aber diese Rotfärbung bei der Tryptophanreaktion nur ganz langsam erscheint, tritt sie bei Gegenwart von Indol, Skatol und Sulfonamid augenblicklich mit der Zugabe der α -Naphthyl-äthylendiamin-dihydrochlorid-Lösung auf. Eine Verwechslung ist also kaum möglich.

Klinische Bedeutung der Tryptophanbestimmung.

Im Basler Kinderspital sind in den Jahren 1940—1949 insgesamt 273 Liquores von Patienten auf Tryptophan, im allgemeinen auch auf Gesamt-Eiweiß, Zellzahl und Zuckergehalt untersucht worden.

In der folgenden Tabelle I ist die Verteilung der Fälle mit tryptophanpositiven und mit tryptophannegativen Liquores auf die einzelnen Krankheiten zusammengestellt. In der ersten Kolonne stehen die Fälle des Basler Kinderspitals, in den folgenden die in der Literatur angeführten Fälle. Die tryptophanpositiven Patienten findet man in jeder Reihe oben, die tryptophannegativen unten. Fälle, bei denen der Liquor purulent, blutig oder xanthochrom war, sind — soweit sie von den einzelnen Autoren als solche bezeichnet wurden — mit einem * versehen. Wir untersuchen die Liquorproben in möglichst frischem Zustand und zentrifugiert.

An fremden Kliniken wurden 387 tuberkulöse Meningitiden auf Tryptophan im Liquor untersucht, 311 zeigten eine positive Reaktion.

Von den 45 Patienten des Basler Kinderspitals waren alle mindestens einmal tryptophanpositiv, einer von ihnen zeigte purulenten Liquor. 82% aller angeführten Fälle von Meningitis tuberculosa

TABELLE I.

		Kinderspital Basel	1937	1938	1936	1923	1939	1945
			Baxter	Boheff	Bock	Brugi	Fanconi	Fanconi
		1	2	3	4	5	6	7
(Ein * soll sagen, daß bei dem betreffenden Patienten der Liquor purulent, xanthochrom oder blutig war.)	+	44/1*	41	35	19	12	15	
	-						1	
Meningitis purulenta	+	1/3*	2*	6			3	
	-							
Meningitis meningococcica	+	13*	2*	5	2			
	-	4*	5					
Meningitis pneumococcica	+	1/4*						
	-	1						
Meningitis staphylococcica	+				1			
	-	1						
Meningitis streptococcica	+							
	-							
Influenza-Meningitis	+	2*						
	-	1			1			
Mumps-Meningitis	+	1*						
	-	4						
Meningitis serosa	+	1/1*						
	-	2		8				
Meningismus	+	1						
	-	8		11		2		
Poliomyelitis ant. acuta und Polioencephalitis	+	5/3*					1	42
	-	46	2	7	6		24	123
Lues cerebri	+	2						
	-		2					
Tabes dorsalis	+							
	-							
Encephalitis	+	2						
	-	7	1	8	7			
Encephalomyel. disseminata	+							
	-							
Influenza-Encephalitis	+							
	-	3						
Masern-Encephalitis	+							
	-	2						
Pertussis-Encephalose	+							
	-	2						
Toxoplasmosis cerebri	+	3*						
	-	1						
Encephalitis u. Hydrocephalus	+							
	-							
Infekt. tox. Encephalose	+							
	-	2						
Postencephalitischer Zustand	+							
	-							

gaben demnach eine positive Tryptophanreaktion. *Aiello* fand bei der Durchsicht der italienischen Literatur sogar 90% positiv.

Nach *Bock*, *Lichtenberg*, *Miyajima* und *Pongratz* fällt die Reaktion schon im Frühstadium, nach *Baxter* am 8. Tag der Krankheit positiv aus, nach *Sonnemann* aber erst 10 Tage vor dem Tod. *Fanconi* fand sie im Frühstadium oft negativ.

Von unseren 45 Fällen wurden 20 infolge verspäteter Einlieferung der Patienten erst kurz vor dem Tode lumbalpunktiert. Die an diesem Zeitpunkt ausgeführte Tryptophan-Reaktion fiel stets positiv aus. In einem Fall handelte es sich um purulenten Liquor. Von den übrigen 25 Fällen zeigten 19 beim Auftreten meningitischer Zeichen (Nackensteifheit usw.) eine positive Reaktion. Diese trat in 6 Fällen erst einige Tage (4, 5, 5, 8, 13, 13) nach dem Manifestwerden der Meningitis auf. Der Liquorzucker ist in 5 Fällen schon vor dem Positivwerden der Tryptophanreaktion vermindert gewesen, in 8 Fällen gleichzeitig und in 3 Fällen erst nachher. *Lichtenberg*, *Rosenblatt* und *Schumacher* fanden, daß die Intensität der positiven Reaktion mit dem Fortschreiten der tuberkulösen Meningitis zunimmt, nach *Sonnemann* erreicht sie 2 Tage vor dem Tod ihren Höhepunkt. In 3 Fällen konnten wir beobachten, daß die Reaktion vor dem Tode stärker ausfiel.

Bei 4 erfolgreich mit Streptomycin behandelten Patienten sahen wir mit dem Zurückweichen der Krankheitszeichen und mit der allmählichen Abnahme des Liquor-Eiweißes die Tryptophanprobe schwächer positiv und schließlich negativ werden.

Übereinstimmend berichten *Aiello*, *Baxter*, *Fanconi*, *Gradwohl*, *Lichtenberg*, *Rosenblatt* und *Schumacher*, daß bei der Tryptophan-Reaktion in purulentem, blutigem und xanthochromem Liquor kein violetter, sondern ein roter Farbring erscheine. Sie bezeichnen dies als «falsche Reaktion». *Bobeff*, *Bock* und *Pongratz* beobachteten bei solchen Liquores lediglich einen besonders kräftigen Farbring. Das Zentrifugieren des Liquors ändert übrigens am Ausfall dieser «falschen Reaktion» nichts.

Baxter, *Lichtenberg* und *Schumacher* führen die «falsche Reaktion» im blutigen Liquor auf die Anwesenheit von Blutserum zurück. Ich möchte hier daran erinnern (siehe S. 4 unten), daß *Fuerth* und seine Mitarbeiter mit einem Abbauprodukt des Tryptophans, dem Indol, eine Rotfärbung der *Voisenetschen* Tryptophanprobe erhalten haben. Andererseits wird die Tryptophanprobe durch einen Zellgehalt nach *Aiello* unter 400/3, nach *Fan-*

coni unter 3000/3 nicht beeinflußt. Letzterer fand bei 33 000/3 Erythrozyten eine negative Reaktion. Wir erhielten noch eine negative Reaktion bei 7000/3 Erythrozyten und in einem Fall mit 11 400/3 Leukozyten.

Aus Tabelle I geht hervor, daß die Mehrzahl unserer Patienten (34 von 59), welche nicht an einer tuberkulösen Meningitis erkrankt und doch tryptophanpositiv waren, purulenten, blutigen oder xanthochromen Liquor aufwies. Von den 28 tryptophanpositiven Meningitiden nicht-tuberkulöser Ätiologie hatten 24 einen eitrigen Liquor.

Fanconi fand bei 23% seiner Poliomyelitis-Patienten eine positive Tryptophanreaktion. Von unseren 54 darauf untersuchten Polio-Fällen waren 8 tryptophanpositiv, davon 3 purulent. Die intensivsten Tryptophanreaktionen überhaupt, zusammen mit einer ungeheuren Gesamt-Eiweiß-Vermehrung (bis 40‰!) im Liquor, sahen wir in 3 Fällen von Toxoplasmosis cerebri.

Fassen wir unsere eigenen Befunde zusammen:

Bei 104 (von 273) am Basler Kinderspital untersuchten Patienten fiel die Tryptophanprobe mindestens einmal positiv aus. Davon waren 45 an tuberkulöser Meningitis erkrankt, 34 zeigten einen eitrigen, blutigen oder xanthochromen Liquor und deshalb eine falsche positive Reaktion. Die übrigen 25 tryptophanpositiven Fälle verteilen sich, mit Ausnahme der Toxoplasmose, regellos auf alle möglichen Krankheiten.

An 42 Liquorproben von 18 Patienten wurden quantitative Tryptophanbestimmungen vorgenommen (siehe Tab. II). Neben den gebräuchlichen Liquordaten sind noch angegeben:

- a) die Konzentration des Tryptophans im Liquor in mg% (eigentlich erfaßt dieser Wert nur das im Eiweiß enthaltene Tryptophan. Die Menge des freien Liquor-Tryptophans ist jedoch in der Regel so klein, daß sie ohne Bedenken vernachlässigt werden kann),
- b) der Tryptophangehalt des Liquor-Eiweißes in % des Eiweißes.

Die einzelnen Werte können in der Tabelle nachgesehen werden. Allgemein fallen die hohen Tryptophan-Konzentrationen im Liquor bei Meningitis tuberculosa (bis 11,7 mg%) und der Tryptophanreichtum des Liquor-Eiweißes bei Hydrocephalie (bis 2,7%) auf. Es ergeben sich folgende mittlere Werte:

TABELLE II.
Quantitative Tryptophanwerte.

Nr.	Name	Krankheit	Datum	Liquor	Zellzahl	Pandy	Ges.-Eiw. in ‰	Tr'ph. im Liquor in mg ‰	Tr'ph.-Ge- halt des Eiw. in ‰	Qual. Tr'ph.- Probe
1.	S. L.	Meningitis tuberculosa	7. 6.	trüb	4500/3	++	3,0	3,6	1,2	++
2.	D. J.-J.	Meningitis tuberculosa	16. 12.	xantho.	980/3	++	5,5	5,3	1,0	++
			27. 12.	klar	1240/3	++	6,0	11,7	1,95	++
			2. 1.	xantho.	906/3	++	5,0	7,3	1,45	++
			9. 1.	xantho.	830/3	++	5,0	6,5	1,3	++
3.	S. A.	Meningitis tuberculosa	27. 12.	klar	260/3	+	2,0	1,9	0,95	+
			31. 12.	klar	4000/3	+	2,0	1,7	0,85	+
			9. 1.	klar	3090/3	+	1,5	1,9	1,2	+
4.	M. E.	Meningitis tuberculosa	27. 12.	klar	800/3	++	3,0	4,3	1,4	++
			2. 1.	klar	640/3	+	3,0	4,1	1,4	++
			9. 1.	klar	645/3	++	4,5	4,6	1,1	++
5.	L. M.	Meningitis tuberculosa	8. 6.	trüb	1600/3	+	1,5	2,7	1,8	+
			19. 12.	klar	660/3	++	3,0	4,0	1,3	++
			2. 1.	klar	220/3	++	2,0	2,7	1,4	++
			9. 1.	klar	280/3	++	2,0	2,4	1,2	++
6.	P. B.	Meningitis tuberculosa	1. 6.	klar	693/3	+	1,5	1,65	1,1	++
			2. 6.	klar	614/3	+	1,5	1,65	1,1	++
			3. 6.	klar	1960/3	+	1,5	1,9	1,3	++
			7. 6.	trüb	600/3	+	1,0	1,3	1,3	++

7.	H. L.	Meningitis tuberculosa	29. 12. 11. 1.	klar klar	96/3 225/3	(+) (+)	0,25 0,5	0,2 0,4	0,9 0,8	—
8.	F. P.	Meningitis tuberculosa	8. 6.	trüb	1780/3	++	3,0	2,6	0,9	+
9.	M. U.	Meningitis tuberculosa und epidemia kombiniert (beide Erreger nachgewiesen)	19. 12. 27. 12. 9. 1.	klar klar klar	1115/3 780/3 1690/3	+ (+) +	0,75 1,5 1,5	1,25 1,3 1,8	1,7 0,9 1,1	(+) (+) +
10.	S. K.	Meningitis epidemica	31. 12. 2. 1. 5. 1. 7. 1. 9. 1.	trüb trüb klar klar klar	5952/3 1196/3 384/3 123/3 92/3	(+) (+) (+) (+) (+)	2,0 1,0 1,0 1,0 0,5	2,4 1,3 1,2 1,0 0,7	1,2 1,3 1,2 1,0 1,3	+ + + + (+)
11.	K. V.	Meningitis epidemica	3. 6.	trüb	56000/3	+	1,5	1,45	1,0	+
12.	S. A.	Meningitis Ätiologie?	6. 1. 9. 1.	klar trüb	2018/3 2116/3	(+) (+)	0,33 0,5	0,45 0,9	1,3 1,8	— (+)
13.	C. A.	Mumps-Meningo-Encephalitis	16. 12. 9. 1.	klar klar	280/3 242/3	(+) (+)	0,41 0,75	0,5 0,65	1,3 0,9	— (+)
14.	G. U.	Hydrocephalus	12. 1.	klar	0/3	—	0,125	0,35	2,7	—
15.	R. B.	Idiotie, Hydrocephalus int.	10. 6.	klar	2/3	((+))	0,125	0,23	1,7	—
16.	S. J.	Dystrophie, Hydrocephalus	5. 1. 11. 1.	klar klar	6/3 13/3	— —	0,125 0,125	0,2 0,19	1,8 1,5	— —
17.	S. H.	Hydrocephalus	22. 12. 9. 1.	klar klar	2/3 6/3	— (+)	0,16 0,25	0,3 0,4	2,0 1,6	— —
18.	F.	Alter Cerebralschaden	5. 1.	klar	2/3	(+)	0,75	0,55	0,75	(+)

- a) für die Tryptophan-Konzentration im Liquor
 bei Meningitis tuberculosa 3,15 mg% (9 Fälle)
 bei Meningitis nicht tuberkulöser Ätiologie 1,05 mg% (4 Fälle)
 bei den übrigen Erkrankungen 0,32 mg% (5 Fälle)
- b) für den Tryptophangehalt des Liquor-Eiweißes
 bei Meningitis tuberculosa 1,22% (9 Fälle)
 bei Meningitis nicht tuberkulöser Ätiologie 1,23% (4 Fälle)
 bei Hydrocephalie 1,9% (4 Fälle)

Klinisch erweist sich der Tryptophanwert bei Meningitis tuberculosa als empfindlicher Indikator des Krankheitsverlaufs, empfindlicher als Gesamt-Eiweiß-Wert und Zellzahl. So zeigt Fall 2 (Fig. 1) mit hoher Tryptophan-Konzentration im Liquor und vorübergehend auch hohem Tryptophangehalt des Eiweißes eine

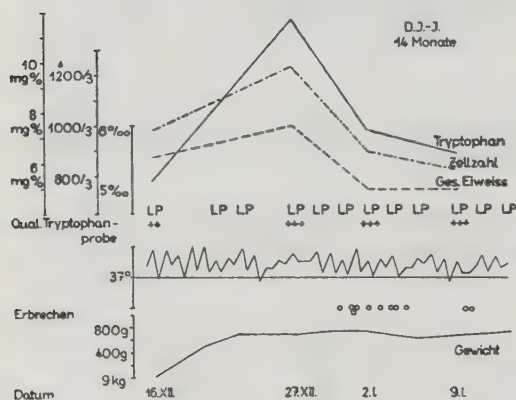


Fig. 1. Meningitis tuberculosa, schweres Krankheitsbild. D. J.-J., 14 Monate alt, vor 5 Monaten erkrankt. Gegen Ende des Jahres war das Kind apathisch, es wollte nicht spielen und zeigte kein Interesse an seiner Umgebung. Mit der wieder regelmäßig aufgenommenen intralumbalen Streptomycin-Therapie besserte sich der bedrohliche Zustand zusehends.

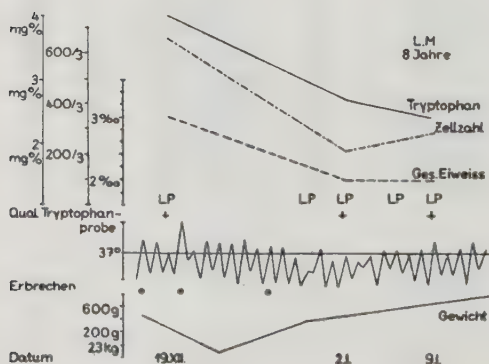


Fig. 2. Meningitis tuberculosa. L. M., 8 Jahre alt, vor 9 Monaten im Anschluß an Osteomyelitis erkrankt. Mitte Dezember: Meningitiszeichen (Erbrechen, Cri encéphalique), Temperatur subfebril, hoher Puls, Appetit schlecht, ebenso AZ. Anfang Januar: kein Erbrechen mehr, AZ besser, Gewichtszunahme.

schwere Verlaufsform, Fall 5 (Fig. 2) mit mittleren Tryptophanwerten ein mittelschweres Krankheitsbild und Fall 7³ mit sehr kleinen Tryptophanwerten einen gutartigen Verlauf.

Die Herkunft des Tryptophans im Liquor.

Zwei Fragen stellen sich:

Handelt es sich bei dem durch die qualitative Reaktion nachgewiesenen vermehrten Liquor-Tryptophan um freies oder um gebundenes Tryptophan?

Wie kommt es zu seiner Vermehrung, sei es nun frei oder im Liquor-Eiweiß gebunden?

Bobeff und *Griep* haben nur bei vermehrtem Gesamt-Eiweiß eine positive Tryptophanprobe und *Dietrich-Wuellenweber*, *Fanconi* und *Kraus-Mezey* in normalen Liquores stets eine negative Reaktion gefunden. *Fanconi* stellt außerdem eine Abhängigkeit zwischen Tryptophan-Reaktion und Gesamt-Eiweiß-Wert, insbesondere Globulinwert, fest.

Andererseits wird von *Aiello*, *Baxter*, *Dietrich-Wuellenweber*, *Kraus-Mezey*, *Lichtenberg* und *Schumacher* darauf hingewiesen, daß die Probe bei vermehrtem Eiweiß auch negativ ausfalle, die Eiweißvermehrung also nicht die einzige Ursache der positiven Reaktion sein könne. (Siehe auch Tab. III. Solche Liquores bilden die Ausnahme!)

Über die zweite, wichtigere Frage nach der Herkunft des vermehrten Tryptophans bestehen viele Ansichten. *Aiello* glaubt, daß es aus dem tryptophanreichen Fibrin (siehe Tab. IV) durch Autolyse (*Lenk* und *Pollak* haben im tuberkulös-meningitischen Liquor die peptidspaltenden Fermente vermehrt gefunden) frei werde. *Fildes* und *Knight* glauben, das Tryptophan werde von den im Liquor vorhandenen Tuberkelbazillen synthetisiert (?). Verschiedene Autoren haben in meningitischen Liquores erhöhte Aminosäure-Werte festgestellt. *Halpern* und *Kraus-Mezey* führen sie auf Leukozytenabbau zurück, nach *Okada* geht die Aminosäurenvermehrung parallel der Pleozytose. Nach *Wiechmann* beruht sie auf einem toxischen Zellzerfall im Gehirn und nach *Lickint* auf einer bei Meningitis erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke. Er findet übrigens bei tuberkulöser Me-

³ H. L., 10 Jahre alt, vor 5 Monaten erkrankt. Seit 2 Monaten beschwerdefrei: keine Meningitis-Zeichen, kein Erbrechen. schwach subfebrile Temperaturen, guter Appetit, Gewichtszunahme.

TABELLE III.

Qualitative Tryptophanprobe und Gesamt-Eiweiß-Werte.

(Die Zahlen für Men. tbc.-Liquores stehen in Klammern.)

Liquores, welche mehr als 3000/3 Leukocyten oder über 2500/3 Erythrocyten enthalten, sind nicht in die Tabelle aufgenommen.

Ges.-Eiweiß- Wert in ‰	Ausfall der qualitativen Tryptophanprobe			
	—	(+)	+	++
5,0				
4,0				1
3,5			(1)	
3,0		(1)	(5)	1 (1)
2,5	(2)	1	1 (14)	(5)
2,25			(1)	
2,0	(2)	(3)	3 (18)	(1)
1,66	(3)	(1)	1 (14)	(1)
1,5		(3)	2 (4)	
1,25	(2)	1 (10)	3 (23)	(1)
1,2			(1)	
1,1				
1,0	8 (11)	(4)	5 (8)	(1)
0,85			(1)	
0,75	5 (8)	5 (5)	4 (4)	
0,66	17 (7)	7 (3)	1 (1)	
0,5	11 (8)	3 (4)	1 (1)	
0,46			1	
0,41	17 (4)	3 (1)	2	
0,33	26 (4)	5 (1)		
0,3	(1)			
0,25	26 (3)	2	2	
0,2	18 (1)	2		
0,16	27	1		
0,15	1			
0,125	40	2		
0,1				

Mittlere Eiweißwerte

in ‰	0,35 (0,83)	0,56 (1,11)	1,07 (1,71)	(2,14)
------	-------------	-------------	-------------	--------

ningitis nur wenig erhöhte Aminosäure-Werte! *Kasahara* schließlich kann im Anschluß an intravenöse Tryptophangaben beim Kaninchen in seinem Liquor erhöhte Tryptophanwerte nachweisen.

Zur Abklärung der Frage, ob die Tryptophanvermehrung im Liquor freies oder gebundenes Tryptophan betrifft, *habe ich zahlreiche tryptophanpositive Liquores mit der Eckertschen Methode auf freies Tryptophan untersucht* (siehe S. 7). *Kolorimetrisch*

meßbare Werte, d. h. über 0,1—0,2 mg%, erhielt ich dabei in keinem Fall. Eine positive Tryptophanreaktion im Liquor muß also in der Regel durch Vermehrung des gebundenen Tryptophans zustande kommen.

Dann sind in Tabelle III eine Anzahl Liquores (tuberkulös-meningitische eingeklammert, nicht tuberkulös-meningitische nicht eingeklammert) entsprechend dem Ausfall der Tryptophanreaktion und ihrem Gesamt-Eiweiß-Wert verglichen: Liquores mit hohem Gesamt-Eiweiß zeigen im allgemeinen eine stark positive Tryptophanreaktion, solche mit niedrigem Gesamt-Eiweiß-Wert negative oder doch schwach positive Reaktion.

Errechnet man außerdem nach Tabelle III den durchschnittlichen Gesamt-Eiweiß-Wert der tryptophannegativen, der schwach und der stark tryptophanpositiven Liquores, so ergibt sich, in Figur 3 graphisch dargestellt: *deutlich nimmt mit steigendem Gesamt-Eiweiß auch die Intensität der Tryptophanreaktion zu*. Vergleicht man schließlich in Figur 4 die Intensität der qualitativen Tryptophanreaktion (welche das an Eiweiß gebundene und das freie Tryptophan nachweist) mit dem quantitativen Tryptophan-Wert (welcher nur das im Eiweiß gebundene Tryptophan erfaßt)

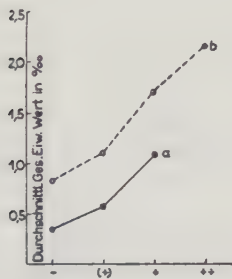


Fig. 3. Durchschnittliche Gesamt-Eiweiß-Werte und Tryptophanreaktion nicht-tuberkulös-meningitischer (a) und tuberkulös-meningitischer (b) Liquores.



Fig. 4. Qualitative Tryptophanprobe (gebundenes und freies Tryptophan nachweisend) und quantitativer Tryptophanwert (erfaßt nur das gebundene Tryptophan) der Liquores der Tab. II, tuberkulös-meningitische sind durch Ringlein markiert.

TABELLE IV.

Verschiedene Eiweißproben wurden mit der qualitativen Probe nach Hopkins
und nach Voisenet auf Tryptophan untersucht:

Konzentration in ‰	l-Tryptophan (Hoffmann-La Roche, Basel) in n/100 Na OH	Normales Serum-Eiweiß mit phys. NaCl-Lösung verdünnt	Humanes Serum-Albumin (Cutter Lab., USA.) in phys. NaCl-Lösung	Humanes Serum-Globulin (Squibb Lab., USA.) in phys. NaCl-Lösung	Human. Serum-Gammaglobulin (Cutter Lab., USA.) in phys. NaCl-Lösung	Humanes Fibrinogen (Lederle Lab., USA.) in phys. NaCl-Lösung	Eigene humane Fibrinogenfraktion in phys. NaCl-Lösung	Humanes Fibrin nach Trypsinverdauung biuret +	Humanes Fibrin nach Trypsinverdauung schwach biuret +	Humanes Thrombin (Lederle Lab., USA.) in phys. NaCl-Lösung
0,0001										
0,0002										
0,0003										
0,0004	H.									
0,0005	(+)									
0,0006	(+)									
0,0007	(+)									
0,0009	(+)									
0,0009	(+)									
0,001	(+) V.									
0,002	+ (+)									
0,003	+ (+)									
0,004	+ (+)									H.
0,005	+ (+)					H.				(+)
0,006	+ (+)					(+)				(+)
0,007	++ +					(+)				(+)
0,008	++ +					(+) V.	H.		H.	(+)
0,009	++ ++					(+) (+)	(+)		(+)	(+)
0,01	++ ++	H. (+)	H. (+) V.	H. (+) V.	H. (+) V.	(+) (+)	(+) V.	H. (+) V.	(+)	+ V.
0,02		(+)	+ (+)	(+) (+)	(+) (+)	+ (+)	+ (+)	(+) (+)	+ V.	+ (+)
0,03		(+)	+ +	+ (+)	(+) (+)		+ (+)	(+) (+)	+ (+)	
0,04		(+)	+ +	+ (+)	(+) (+)	++ +	+ +	+ (+)	+ (+)	++ +
0,05		(+) V.	+ +	+ (+)	+ (+)					
0,06		(+) (+)	+ +	+ +	+ (+)	++ +	+ +	+ +	+ +	
0,07		(+) (+)	+ +	++ +	+ (+)			+ +	+ +	
0,08		(+) (+)	+ +	++ +	+ +	++ +	+ +	+ +	++ ++	++ +
0,09		+ (+)	+ +	++ +	++ +					
0,1		+ +	+ +	++ +	++ +	++ ++	++ ++	++ +	++ ++	
0,2		++ +	++ +							
0,3		++ ++	++ ++							
0,4		++ ++	++ ++					rötliche Farbe!	rötliche Farbe!	
0,5		++ ++								

der Liquores der Tabelle II, so zeigt sich eine *Parallelität von qualitativer Tryptophanprobe und quantitativem Eiweiß-Tryptophan-Wert*. Ein solcher Parallelismus besteht zwischen Tryptophangehalt und Zellzahl des Liquors nicht.

Eine positive Tryptophanreaktion im Liquor muß also in den allermeisten Fällen durch Vermehrung des im Liquor-Eiweiß enthaltenen Tryptophans zustande kommen. Sei es nun, daß das Gesamt-Eiweiß ansteigt oder daß der Prozent-Gehalt des Eiweißes an Tryptophan zunimmt, immer kommt es zu einem Anstieg des Liquor-Tryptophanwertes.

Eine Vermehrung des Gesamt-Eiweißes auf 0,5—1 % gibt meist schon einen positiven Ausfall der Tryptophanprobe (siehe Tab. III und Fig. 3). Deshalb findet man auch bei vielen nicht tuberkulös-meningitischen Liquores — insbesondere bei eitrigen — eine wenigstens schwach positive Tryptophanreaktion.

Bei der tuberkulösen Meningitis sind nun die Gesamt-Eiweiß-Werte auffallend hoch (siehe Tab. II und III und Fig. 3), und damit wäre der fast regelmäßig positive, oft stark positive Ausfall der Tryptophanprobe schon erklärt. Es scheint jedoch, daß bei dieser Krankheit — wenigstens bei ihren schweren Verlaufsformen — auch der Prozentgehalt des Liquor-Eiweißes an Tryptophan zunimmt (vergleiche Fall 2, 5 und 7 der Tab. II).

Wir erinnern daran, daß bei Toxoplasmosis cerebri, wo häufig ein ganz massiver Gehirnabbau stattfindet, die Tryptophanprobe außerordentlich stark positiv ausfällt und das Liquor-Gesamt-Eiweiß zu ungeheuren Werten ansteigt, daß 4 Fälle von Hydrocephalie durchwegs einen hohen Tryptophangehalt (bis 2,7 %) ihres Liquor-Eiweißes zeigen (siehe Tab. II), und daß sich andererseits ein auffallender Tryptophanreichtum der noch lipoid-armen grauen Hirnsubstanz vom Frühgeborenen feststellen läßt (siehe Tab. IV). Diese Umstände legen die Vermutung nahe, daß dieses tryptophanreiche Eiweiß — und bei Meningitis tuberculosa und Toxoplasmosis cerebri vor allem auch die starke Gesamt-Eiweiß-Vermehrung — von einem Abbau des Zentralnervensystems herrührt. Die Frage nach der Herkunft des vermehrten Tryptophans hat sich erweitert zu der Frage: Wie kommt es bei gewissen Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu einer auffallend starken Eiweißvermehrung und zum Auftreten von besonders tryptophanreichem Eiweiß im Liquor?

Tryptophan-, Cholesterin- und Phosphorwert, Goldsol- und

Mastixkurven an einer größeren Anzahl von Liquores bestimmt könnten vielleicht unsere Vermutung bestätigen.

Zusammenfassung.

1. Zwei qualitative Tryptophanproben (nach *Voisenet* und nach *Hopkins*) wurden geprüft und eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Tryptophans im Liquoreiweiß ausgearbeitet, welche auf der Reaktion von *Eckert* beruht.

2. Bei der vergleichenden Prüfung verschiedener Proteine wurden in den höchsten Verdünnungen positive Reaktionen der Lösungen gefunden bei Thrombin und bei Hirnsubstanz (beides menschlicher Herkunft).

3. Die Untersuchungen ließen keine Liquores mit meßbaren Mengen freien Tryptophans auffinden. Es handelt sich bei der «Tryptophanvermehrung» im Liquor durchweg um Vermehrung tryptophanhaltiger Proteine.

4. 82% aller angeführten Fälle von tuberkulöser Meningitis (diejenigen der Literatur einbezogen) zeigten einen tryptophanpositiven Liquor.

5. Bei 104 von 273 am Basler Kinderspital untersuchten Patienten fiel die Tryptophanprobe positiv aus. Davon entfielen 45 auf Meningitis tbc., 34 zeigten einen eitrigen, blutigen oder xanthochromen Liquor (sogenannte falsche Reaktion) und 25 entfielen auf verschiedenartige Zustände.

6. In quantitativer Hinsicht schwankte der Tryptophangehalt auf 100 ccm Liquor bezogen, bei Meningitis tbc. zwischen 0,2 und 11,7 mg; auf 100 mg Liquoreiweiß bezogen, zwischen 0,9 und 1,95%. Die Schwankungsbreite bei andersartigen Meningitiden und Hydrocephalien lag zwischen 0,2 und 2,4 mg pro 100 ccm Liquor, bzw. 0,75 und 2,7% des Liquoreiweißes.

7. Die Tryptophanvermehrung im Liquor ist in der Regel von einer Zunahme des Gesamteiweißes abhängig. Daneben kommt auch eine Vermehrung des Prozentgehaltes der Liquorproteine an Tryptophan vor.

8. Es bleibt zu prüfen, wie weit das Auftreten tryptophanreichen Eiweißes im Liquor Gehirnabbau anzeigt.

Summary.

1. Two qualitative tryptophan tests (according to *Voisenet* and according to *Hopkins*) were tried out and a quantitative

method was evolved to estimate the tryptophan in the liquor protein which is based on *Eckert's* reaction.

2. In comparing several proteins in the highest dilutions positive reactions were obtained in thrombin and brain substance, both of human origin.

3. In none of the cerebral fluids could measurable quantities of free tryptophan be detected. In every case of tryptophan "increase" this was due to an increase of tryptophan containing proteins.

4. 82% of all the cases of tuberculous meningitis mentioned (including those of the literature) had a tryptophan positive liquor.

5. The tryptophan test was positive in 104 of the 273 patients examined in the Basler Kinderspital. 45 of these had tb. meningitis, 34 showed a purulent, sanguinolent, or xanthochromatic liquor (false reaction), and 25 suffered from various other morbid states.

6. The tryptophan content in tb. meningitis varied between 0.2 and 11.7 mg. per 100 c.c. of liquor; the values in 100 mg. liquor different origin the values varied between 0.2 and 2.4 mg./100 c.c. liquor and 0.75 and 2.7% of the liquor protein.

7. The tryptophan increase is as a rule dependent on the increase of the total proteins, but besides that a relative increase in the tryptophan content of the liquor can occur.

8. It remains to be seen in how far the occurrence of proteins rich in tryptophan is an indication for destructive processes in the brain.

Résumé.

1° L'auteur a procédé à une vérification de 2 méthodes qualificatives (de *Voisenet* et de *Hopkins*) pour la mise en évidence du tryptophane dans les protéines du L. C. R., et a élaboré un dosage quantitatif basé sur la réaction d'*Eckert*.

2° Lors de la comparaison de différentes protéines, les réactions ont été positives dans les dilutions les plus grandes pour la thrombine et la substance cérébrale humaines.

3° Les L. C. R. étudiés ne contenaient pas de tryptophane libre en quantités mesurables. Il s'agit en cas d'hypertryptophanorachie d'une augmentation des protéines contenant du tryptophane.

4° 82 % des méningites tuberculeuses étudiées (y compris les cas de la littérature) ont présenté une réaction positive du tryptophane liquidien.

5° Pour un lot de 273 malades examinés à l'Hôpital d'enfants de Bâle, la recherche du tryptophane a été positive dans 104 cas; parmi eux 45 étaient des méningites tuberculeuses, 34 présentaient un L. C. R. purulent, sanglant ou xanthochromique (fausse réaction) et 25 des syndromes variés.

6° Le taux de tryptophane dans les méningites tuberculeuses a oscillé entre 0,2 et 11,2 mg. pour 100 cc. de L. C. R., entre 0,9 et 1,95 mg. pour 100 mg. d'albumine rachidienne. Pour les autres méningites et les hydrocéphalies, ces chiffres ont oscillé respectivement entre 0,2 et 2,4, et entre 0,75 et 2,7.

7° En règle générale, l'augmentation du tryptophane est due à un accroissement de l'albuminorachie; à côté de cela on rencontre aussi une augmentation du pourcentage en tryptophane de l'albumine rachidienne.

8° Il reste à examiner dans quelle mesure l'apparition d'albumines rachidiennes riches en tryptophane est le signe d'une destruction cérébrale.

Literatur.

Adamkiewicz: Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. 9, 156 (1874). — Aiello: Poli-clinico, sez. prat. 29, 537 (1922); Riforma med. 43, 35 (1927); Scritti med. in onore Jemma 1934, 79. — Bamberger, Degkwitz und Glanzmann: Kinderheilk., Berlin 1944, S. 676. — Baxter: Edinburgh Med. J. 44, 663 (1937). — Benedict: J. Biol. Chem. 6, 51 (1909). — Bergmann und Staehelin: Hdb. d. Inn. Med., Berlin 1939, Bd. V (1), S. 409. — Bing: Nervenkrankheiten, Basel 1944, S. 282. — Bobeff: Mschr. f. Kinderheilk. 73, 358 (1938). — Bock: Mschr. f. Kinderheilk. 65, 41 (1936). — Brugi: Pensiero med. 12, 583 (1923). — Dietrich und Wüllenweber: Klin. Wschr. 1928, 1739. — Eckert: J. Biol. Chem. 148, 205 (1943). — Fanconi: Inn. Med. u. Kinderheilk. 57, 460; Poliomyelitis, Basel 1945, S. 360. — Fildes und Knight: Brit. J. exp. Path. 14, 343 (1933). — Fürth und Lieben: Biochem. Zschr. 109, 124 (1920). — Fürth und Nobel: Biochem. Zschr. 109, 103 (1920). — Georgi und Fischer: Bumke, Hdb. d. Neur. Bd. VII (1), S. 259. — Giustra: J. Pédiatr. 11, 805 (1937). — Gleich und Weintraub: Arch. Pediatr. 56, 749 (1939). — Gradwohl: Clinical Lab. meth. and diagn. 1943, S. 877. — Greene und Black: J. Biol. Chem. 155, 1 (1944). — Griep: Nederl. tijdschr. v. geneesk. 81, 5610 (1937) (Ref.: Am. J. Dis. Ch. 56 II, 925). — Guglielmin: Tuberculosi 30, 127 (1938). — Halpern: Zschr. Neur. 120, 148 (1929). — Hehner: The Analyst 21, 94 (1896). — Hopkins und Cole: J. Physiol. 27, 418 (1901); Proc. Roy. Soc. 68, 21 (1901). — Kafka: Liquor cerebrospinalis, Wien 1930, S. 65. — Kasahara: Klin. Wschr. I, 686 (1939). — Kraus: Klin. Wschr. 1937, 1815. — Kraus und Mezey: Schweiz. Arch. Neur. 42, 77 (1938). — Kriete, Ep-

stein und Toomey: Am. J. Dis. Ch. 67, 469 (1944). — Lenk und Pollak: zit. nach Matthes u. Curschmann, Diff.-Diagn., Berlin 1947, S. 202. — Lichtenberg: Am. J. Dis. Ch. 43 I, 32 (1932). — Lickint: Zschr. Neur. 131, 38 (1929). — Marshall: J. Biol. Chem. 122, 263 (1937/38). — Miyajima: Orient. J. Dis. Infants 22, 12 (1937) (Ref.: Am. J. Dis. Ch. 56 II, 1361). — Mouriz: Anv. Ac. méd. quir. españ. 13, 905 (1926). — Okada: zit. nach Halpern. — Pongratz: Münch. Med. Wschr. 21, 814 (1937). — Rosenblatt: Am. Rev. Tuberc. 29, 668 (1934). — Sato Mi: Acta paediatr. japon. 44, 198 (1938) (Ref.: Am. J. Dis. Ch. 57 I, 705). — Schäfer: in Kleinschmidt, Übertragb. Kinderlähmung, Leipzig 1939, S. 158. — Schumacher: Zschr. f. Kinderheilk. 56, 626 (1934). — Sonnemann: Mschr. f. Kinderheilk. 73, 345 (1938). — Spillane: Lancet 1937 I, 560. — Takasu und Gammo: Acta paed. jap. 46, 822 (1940) (Ref.: Am. J. Dis. Ch. 62 I, 187). — Toomey, Fulton und Rea: J. of Pediatr. 14, 372 (1939). — Voisenet: Bull. Soc. chim. Paris (3) 33, 1198 (1905) (Ref.: Chem. Zbl. 1906 I, 90); C. r. de l'Acad. des sc. 1918 II, 766 (Ref.: Chem. Zbl. 1919 II, 649). — Wiechmann: Dtsch. Zschr. f. Nheilk. 91, 245 (1926). — Winkler: Zschr. phys. Ch. 228, 50 (1934).